

Nº 54, dezembro/1999, p. 1-4

## **ESTABELECIMENTO DE CULTURA *IN VITRO* DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO *Boophilus microplus***

Raul Henrique Kessler<sup>1</sup>

Alberto Gomes<sup>2</sup>

Paula R. Capibaribe<sup>3</sup>

Dioclécio da Silva<sup>4</sup>

Maria Aparecida M. Schenk<sup>5</sup>

Os bovinos são hospedeiros de várias espécies de carrapatos, dependendo da região onde são criados. Esses carrapatos são parasitos que causam elevadas perdas à economia, em especial nos países de clima tropical e subtropical, pelos danos causados, diretamente, pelo parasitismo e, indiretamente, pela transmissão de agentes causadores de doença. No Brasil, os bovinos são parasitados por *Boophilus microplus* que transmite os agentes causadores da tristeza parasitária. Os prejuízos causados por este complexo foram avaliados em US\$ 1 bilhão por ano. Os métodos de controle desse carrapato, disponíveis, têm sido ineficientes para reduzir os prejuízos, pelo desenvolvimento de resistência aos carrapaticidas. As vacinas contra o carrapato não têm proporcionado proteção satisfatória. Várias linhas de pesquisa têm sido desenvolvidas no sentido de encontrar alternativas mais eficientes de controle. A mais recente é a da biotecnologia que busca a expressão de determinantes antigênicos do carrapato, em bactérias ou fungos. Entretanto, tais

<sup>1</sup> Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 0575, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: [kessler@cnpqc.embrapa.br](mailto:kessler@cnpqc.embrapa.br)

<sup>2</sup> Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 0104, Embrapa Gado de Corte.

<sup>3</sup> Acadêmica de Biologia da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Estagiária da Embrapa Gado de Corte.

<sup>4</sup> Acadêmico de Medicina Veterinária da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Uniderp), Estagiário da Embrapa Gado de Corte.

<sup>5</sup> Méda.-Veta., M.Sc., CRMV-MS Nº 0157, Embrapa Gado de Corte.

determinantes têm sido buscados nos próprios carrapatos cultivados *in vivo*. Esse trabalho se torna dispendioso e demorado, pois depende da manutenção de uma colônia de carrapatos por meio de constantes infestações de bovinos, ditos doadores, em estábulos apropriados. Além disso, os antígenos, responsáveis pela resposta imune protetora, têm de ser identificados entre um universo de antígenos que compõem todo o indivíduo. O cultivo de células dos diferentes órgãos e tecidos dos carrapatos pode tornar-se uma fonte, *in vitro*, de fácil acesso, para a busca de determinantes antigênicos promissores, além de se constituir num substrato para o cultivo dos hemoparasitos e outros microorganismos por eles transmitidos. Tecidos de várias espécies de carrapatos, inclusive de *B. microplus*, têm sido cultivados, para o estabelecimento de células de linha e o cultivo de protozoários rickettsias e vírus de interesse veterinário. *Anaplasma marginale* tem sido cultivado em células do carrapato *Ixodes scapularis*. O objetivo deste trabalho foi iniciar o cultivo *in vitro* de células embrionárias de *B. microplus*, visando ao estabelecimento de células de linha. As células embrionárias foram obtidas de ovos de teleóginas de uma colônia de *B. microplus* mantida livre de hemoparasitos, na Embrapa Gado de Corte. As teleóginas foram selecionadas ao caírem do doador, lavadas primeiro com água da torneira, depois com água destilada e, em uma capela de fluxo laminar vertical, foram lavadas, rapidamente, com álcool a 70% e água sanitária a 1%. Após essas lavagens, as teleóginas foram imersas em solução de cloreto de benzalcônio a 1%, durante quinze minutos, lavadas novamente com álcool a 70% e, finalmente, com água destilada, esterilizada, contendo antibióticos. As teleóginas, após secas com gaze esterilizada, foram colocadas em placas de Petri, estéreis, e incubadas, em estufa BOD, a 27°C e 80% de umidade relativa, para realizar a postura. Dez dias após o início da postura, os ovos embrionados foram removidos para um tubo de ensaio e submetidos a uma seqüência de lavagens: duas vezes com acetona, dez minutos em solução de White (0,25 gramas de HgCl<sub>2</sub>; 6,5 gramas de Na Cl; 1,25 gramas de HCl; 250 mililitros de álcool etílico a 90% e 750 mililitros de H<sub>2</sub>O) e, finalmente, sete vezes com água destilada esterilizada. Os ovos, superficialmente, esterilizados, foram transferidos para uma placa de Petri, com 2 mililitros a 3 mililitros de meio de cultura, e quebrados, por pressão, com um êmbolo de seringa hipodérmica de vidro, de 20 mililitros. Após a quebra da maioria dos ovos, o material em suspensão foi passado por um filtro de vidro, número zero, para a remoção dos ovos intactos e das cascas. Após a filtragem, o material foi centrifugado a



1.000 rpm, por oito minutos. O precipitado foi ressuspenso em meio de cultura, distribuído em frascos de 25 centímetros quadrados e colocado para incubar, a 28°C. Células de vinte teleóginas foram colocadas em dois frascos, com 4 mililitros de meio de cultura cada um. Inicialmente, o meio foi renovado a cada sete dias, removendo-se 2 mililitros e colocando-se 2 mililitros de meio novo. À medida em que as culturas apresentavam maior crescimento, o meio de cultura era renovado duas vezes por semana. Quando houve a formação de lâmina de células convergentes foram realizadas subculturas ou repicagens. As subculturas foram realizadas, suspendendo-se as células por agitação, removendo-se a suspensão, distribuindo-as em dois outros frascos e completando-se o meio de cultura para 4 mililitros. Após o terceiro subcultivo, as células da metade dos frascos foram ressuspensas, removendo-se o meio de cultura e colocando-se 4 mililitros de solução de tripsina (1:250) a 0,25% em salina de Dulbecco, livre de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , e incubando-se a 37°C por cinco a dez minutos. Após as células se descolarem, foram adicionados 10 mililitros de meio de cultura, e a suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm, por oito minutos. O sedimento foi resuspenso com 12 mililitros de meio de cultura, sendo a suspensão distribuída no frasco original e dois novos frascos, em volumes de 4 mililitros. O meio de cultura foi composto de meio de Leibovitz L-15 e meio mínimo essencial de Eagle, com sais de Hank e glutamina, suplementado com 10% de caldo triptose fosfato, 20% de soro fetal bovino, 0,1% fração V da albumina bovina e antibióticos (inicialmente utilizou-se penicilina, 100 UI/ml, e estreptomicina, 100 µg/ml, posteriormente passou-se a utilizar somente gentamicina 50 µg/ml). O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,7 e o meio foi esterilizado em filtro de nitrocelulose com 22 µm de poro. Os frascos, contendo a suspensão de células embrionárias, foram observados diariamente, em microscópio invertido. Após 24 horas de cultivo, observaram-se poucas células aderidas. Com uma semana de cultivo, um número expressivo de células encontrava-se aderida, algumas apresentando expansões, tipo pseudópodos. Com o tempo, puderam ser observados vários tipos de células: redondas, fusiformes e fibroblastoides. Algumas das células fusiformes apresentavam vacúolos e, outras, citoplasma granular. Na primeira tentativa, conseguiu manter-se a cultura primária por três meses, quando perdeu-se o material por contaminação com fungo. Introduziu-se, então, anfotericina B no meio de cultivo. Entretanto, novos cultivos iniciados continuaram a apresentar contaminação com fungo e bactérias. Foram tentados outros fungicidas, como fungizona e micostatin, com os

mesmos resultados. A contaminação com bactérias foi resolvida, em parte, com a introdução da gentamicina no meio de cultura. Uma cultura foi mantida por oito meses quando, também, apresentou contaminação bacteriana. As culturas atuais estão sendo mantidas por seis meses, tendo-se realizado, neste período, seis subcultivos ou repicagens. Constatou-se que, após três meses de cultivo, as células já toleravam o descolamento com o uso de tripsina, aderindo rapidamente aos novos frascos de cultura. O problema com contaminações somente foi resolvido com a prática, observando-se o uso adequado da capela de fluxo laminar e cuidados ao manipular o material durante a preparação e troca do meio de cultura, das culturas iniciais e preparação das subculturas. Este trabalho está em andamento, buscando-se o estabelecimento de células de linha, isto é, células que se diferenciam, se multiplicam regularmente e têm vida ilimitada.

Tiragem: 50 exemplares